

# SUSCEPTIBILIDAD A LA CORROSIÓN LOCALIZADA Y BIOCOMPATIBILIDAD DE ACEROS INOXIDABLES DE USO QUIRÚRGICO

## SUSCEPTIBILITY TO LOCALIZED CORROSION AND BIOCOMPATIBILITY OF STAINLESS STEELS FOR SURGICAL USE

*R. W. Gregorutti<sup>1</sup>, J. E. Grau<sup>1</sup>, D. Castrogiovanni<sup>2</sup>, J. Parisi<sup>2</sup>, M. Reigosa<sup>2</sup>, C. I. Elsner<sup>3</sup>*

*1.- Laboratorio de Entrenamiento Multidisciplinario para la Investigación Tecnológica (LEMIT)*

*2.- Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, CONICET-CIC)*

*3.- Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT, CIC-CONICET-UNLP)*

7

### RESUMEN

La resistencia a la corrosión y biocompatibilidad son algunas de las propiedades más importantes que deben cumplir las aleaciones destinadas a la fabricación de implantes quirúrgicos. En el presente trabajo, se analizó la susceptibilidad a la corrosión localizada y la citotoxicidad de los aceros inoxidables ASTM F745 y Dúplex ASTM A890 Tipo 5A. La susceptibilidad a la corrosión localizada se evaluó mediante ensayos de polarización cíclica usando una solución acuosa de 0,9% de NaCl a 37°C y pH entre 4 y 9. Por otro lado, los bioensayos desarrollados para evaluar la citotoxicidad fueron los de rojo neutro (RN), MTT y colágeno Tipo I, de acuerdo a NORMA ISO 10995-5, empleando como sustrato diana la línea celular osteoblástica de rata, UMR-106 (ATCC, CRL-1661). Paralelamente se realizó la técnica de contacto directo, donde se cultivaron las células UMR-106 sobre las superficies pulidas y esterilizadas de las aleaciones mencionadas para determinar la biocompatibilidad de las mismas.

Los ensayos de polarización cíclica indicaron que el inoxidable Dúplex presenta una menor susceptibilidad a sufrir picado y una mayor capacidad de repasivación que el acero inoxidable austenítico ASTM F745. La mejor respuesta a la corrosión del acero inoxidable Dúplex, puede atribuirse a su mayor contenido de Cr y N que incrementan el índice de resistencia a la corrosión por picado (PREN: Pitting Resistance Equivalent Number), en medios que contienen iones cloruro.

Los bioensayos de RN, MTT y colágeno tipo I, demostraron la ausencia de compuestos citotóxicos liberados al medio de extracción. La técnica de contacto directo puso en evidencia que las células UMR-106 se adhieren a las superficies de las aleaciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la metodología de análisis empleada se puede concluir que ambos aceros inoxidable poseen una alta biocompatibilidad.

**Palabras clave:** *Implantes quirúrgicos, corrosión localizada, biocompatibilidad.*

## ABSTRACT

Corrosion resistance and biocompatibility are some of the most important properties to be satisfied by the alloys used to elaborate surgical implants. In the present work, the susceptibility to localized corrosion and cytotoxicity of ASTM F745 austenitic and ASTM A890 Type 5A Duplex stainless steels were analyzed. ASTM F745 is used for cast implant, while Duplex steel has also been investigated for orthodontic bracket fabrication.

Susceptibility to localized corrosion was evaluated by means of cyclic polarization tests using aqueous solution of 0.9 wt % NaCl at 37 °C and pH between 4 and 9. On the other hand, cytotoxicity was analyzed by neutral red (NR), methyl tetrazolium (MTT) and collagen type I assays, according to ISO 10995-5 Standard, using the rat osteoblastic cell line UMR-106 (ATCC, CRL-1661). Complementing the biological studies, the technique of direct contact was performed, by which the UMR-106 cells were cultivated on the alloys surfaces, previously sterilized, to evaluate the biocompatibility.

Cyclic polarization tests revealed that Duplex stainless steel has a lower susceptibility to pitting corrosion and a greater repassivation capacity than ASTM F745 austenitic stainless steel. The better anti-corrosion behavior of the duplex stainless steel can be ascribed to its higher Cr and N content, that increase the Pitting Resistance Equivalent Number (PREN) in media containing Cl<sup>-</sup> ions.

From the biological perspective, RN, MTT and collagen type I assays, show the absence of cytotoxic compounds released to the environment from both stainless steels. At the same time, the direct contact technique showed that UMR-106 cells adhere to smooth surfaces of the alloys.

According to the methodology of analysis used, it can be concluded that both stainless steels have a high biocompatibility.

**Keywords:** *surgical implants, localized corrosion, biocompatibility.*

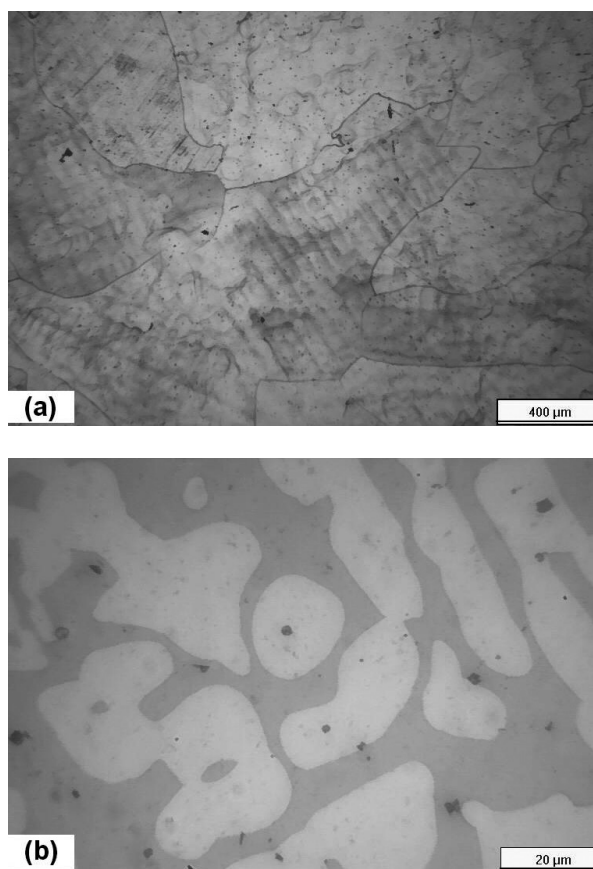
## INTRODUCCIÓN

Los aceros inoxidable austeníticos ASTM F138 y ASTM F745 son usados para elaborar distintos tipos de prótesis e implantes quirúrgicos, además de ser usados en odontología para alambres de ortodoncia. Estos aceros se caracterizan por poseer una aceptable biocompatibilidad, y fundamentalmente, por su bajo costo respecto de las aleaciones de Ti y Co-Cr-Mo. Sin embargo, su resistencia a la corrosión es menor, por lo que presenta mayor susceptibilidad a sufrir procesos de corrosión localizada tales como, corrosión por picado, por crevice y corrosión bajo tensión.

Otra desventaja de los aceros inoxidable austeníticos es el porcentaje de Ni (12-14%),

elemento que puede causar reacciones alérgicas y sistémico-tóxicas [1-4]. Por estos motivos, se ha evaluado al acero inoxidable Dúplex como posible sustituto de los aceros inoxidable austeníticos, existiendo referencias bibliográficas que analizan este material en aplicaciones ortopédicas, incluyendo estudios de biocompatibilidad in vitro, y en aplicaciones odontológicas [5-11]. El acero inoxidable Dúplex se diferencia de los aceros ASTM F138 y ASTM F745 en que presenta mayor contenido de Cr y menor contenido de Ni, lo que genera una estructura bifásica consistente en ferrita y austenita, en proporciones aproximadas al 50 %, como se ilustra en la Figura 1.

Los implantes están sometidos al medio fisiológico corrosivo del cuerpo humano, el que a su vez puede disminuir su pH debido a hematomas, inflamaciones e infecciones de los tejidos adyacentes, volviéndose más agresivo aún. En este contexto, en el presente trabajo se evaluó la susceptibilidad a la corrosión localizada en medios que simulan el entorno del cuerpo humano a distintos pH, y la biocompatibilidad de los aceros inoxidables ASTM F745 y Dúplex, mediante estudios de citotoxicidad.



**Figura 1.** (a) Inoxidable austenítico ASTM F745; (b) Inoxidable Dúplex. Ambos en estado de solubilizado.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los aceros inoxidables ASTM F745 y Dúplex fueron obtenidos por fusión y colado en horno de inducción. Posteriormente, fueron sometidos a tratamientos térmicos de solubilizado, para disolver carburos y fases fragilizantes, como la fase sigma (Fe-Cr). Las composiciones químicas obtenidas se detallan en la Tabla 1.

La susceptibilidad a la corrosión localizada se evaluó mediante ensayos de polarización cíclica usando una solución acuosa de NaCl al 0,9% a 37°C con pH entre 4 y 9. La solución fue deaerada burbujeando N<sub>2</sub> durante una hora. En la celda electroquímica el material a estudiar fue el electrodo de trabajo (cilindro con área expuesta de 3 cm<sup>2</sup>), como referencia se usó un electrodo de calomel saturado (ECS) y como contra electrodo una banda de gran área de acero inoxidable en arreglo cilíndrico. El barrido de potencial fue realizado con un potenciostato/galvanostato PAR 273A acoplado a una PC y comandados por el programa CorrWear. El barrido de potencial se inició en un valor 0,2 V más catódico que el potencial de circuito abierto (E<sub>ca</sub>) del sistema y se continuó en sentido anódico, definiendo la condición de inversión de la dirección de barrido en un potencial de 3 V vs. el potencial del ECS o en valor máximo permisible de la densidad de corriente de 1.10<sup>-4</sup> A/cm<sup>2</sup>. La velocidad de barrido fue de 0,167 mV/s.

Los ensayos de biocompatibilidad se realizaron empleando la línea celular osteoblástica de rata UMR-106 (ATCC, CRL-1661), la que fue cultivada en medio DMEM 10% SBF a 37°C y 5% de anhídrido carbónico. El material a ensayar se puso en contacto con el vehículo de extracción

**Tabla 1:** Composición química, en masa %, de los aceros inoxidables analizados

Acero	C	Cr	Ni	Mo	Si	Mn	N
ASTM F745	0,04	18,09	12,46	2,02	0,49	0,9	-
Dúplex	0,03	25,22	7,07	4,10	1,00	0,78	0,30

(VE), consistente en el medio de cultivo, durante 72 horas a 37°C, siguiendo la relación superficie/volumen de 2 cm<sup>2</sup>/mL, de acuerdo a lo especificado por la NORMA ISO 10995-5. Los bioensayos desarrollados para evaluar la citotoxicidad fueron los de rojo neutro, ensayo de reducción del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico y ensayo de colágeno Tipo I.

Paralelamente se realizó la técnica de contacto directo. Dicha técnica pone en evidencia la competencia existente entre las células y el producto a analizar. Las células UMR-106 fueron cultivadas conjuntamente sobre las superficies pulidas y esterilizadas de las aleaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Susceptibilidad a la corrosión localizada

La susceptibilidad a la corrosión localizada fue evaluada mediante el ensayo de polarización cíclica, por el cual es posible determinar el potencial de corrosión ( $E_{\text{Corr}}$ ), el potencial de ruptura de la película pasiva ( $E_{\text{Rupt}}$ ) y el potencial de protección o repasivación ( $E_{\text{Repas}}$ ). El  $E_{\text{Corr}}$  es el potencial de circuito abierto que adquiere el

material en contacto con el medio corrosivo cuando no hay circulación neta de corriente; el  $E_{\text{Rupt}}$  es el potencial a partir del cual se rompe la pasividad del material y se observa un aumento considerable de la corriente de disolución y el  $E_{\text{Repas}}$  es el potencial al cual se completa el lazo de histéresis, denotando la repasivación del material. Cuanto mayor sea la diferencia ( $E_{\text{Rupt}} - E_{\text{Corr}}$ ) mayor será el rango de pasividad del material en el medio considerado y, por lo tanto, menor será su tendencia a desarrollar un proceso de picado. A su vez, cuanto menor sea la diferencia ( $E_{\text{Rupt}} - E_{\text{Repas}}$ ) mayor será la capacidad de repasivación del material. En las Figuras 2 a 4 se ilustran las curvas de polarización cíclica obtenidas para ambos materiales al ser expuestos al electrolito en las distintas condiciones de pH consideradas. El detalle de los valores de potencial significativos para el presente análisis se presenta en la Tabla 2.

Ambos materiales mostraron valores de  $E_{\text{Corr}}$  en el rango -0,34/-0,18 V(ECS). En ningún caso se observaron tendencias monótonas de variación con el pH. Una diferencia significativa de comportamiento entre ambos materiales radica no sólo en el amplio rango de pasividad presentado por el acero Dúplex, sino que también para todas las

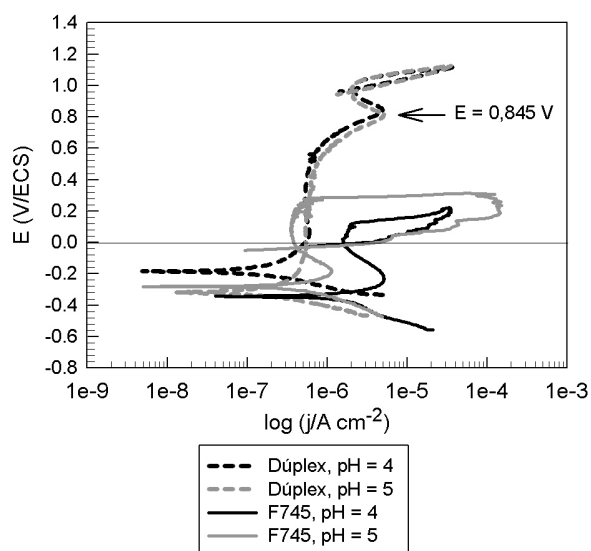


Figura 2. Curvas de polarización obtenidas a pH 4 y 5.

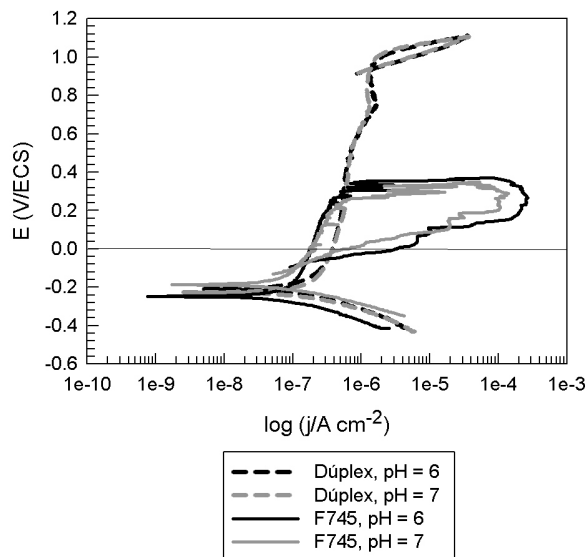


Figura 3. Curvas de polarización obtenidas a pH 5 y 6.

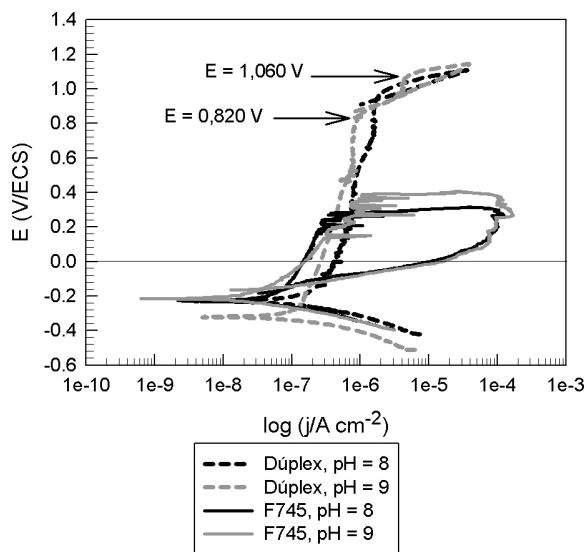


Figura 4. Curvas de polarización obtenidas a pH 8 y 9.

condiciones de pH consideradas, el  $E_{Repas}$  estuvo muy próximo al  $E_{Rupt}$ , lo que permite establecer que para este material su condición de pasividad resulta más estable y por ende le confiere mayor potencial para ser utilizado como biomaterial.

Tomando como referencia el criterio teórico definido por el índice de resistencia a la corrosión por picado (PREN: Pitting Resistance Equivalent Number), en medios que contienen iones cloruro, ec. (1) [12], este comportamiento podría ser atribuido a su mayor contenido de Cr y Mo y a la presencia de N en su composición.

$$PREN = \%Cr + 3,3\%Mo + 16\%N \quad (1)$$

De acuerdo a las composiciones químicas indicadas en la Tabla 1, el valor del PREN para el acero Duplex fue de 43,5, sensiblemente mayor al correspondiente al acero ASTM F745 cuyo valor fue de 24,8, lo que estaría indicando una mayor resistencia al picado del primero.

Una particularidad que presentaron las curvas obtenidas para el acero Duplex fue la definición

de un pico anódico de corriente a potenciales cercanos a 0,845 V(ECS); la definición del pico fue haciéndose menos notoria a medida que se alcalinizaba el electrolito. Tomando como referencia comportamientos similares reportados en la bibliografía este pico podría atribuirse a la generación de iones solubles. En el caso de materiales con alto contenido de Cr, como los aceros inoxidable analizados en el presente trabajo, se ha reportado que a altos potenciales, el Cr podría oxidarse formando iones dicromato ( $Cr_2O_7^{2-}$ ), que son solubles en la solución de NaCl utilizada. El proceso se conoce como disolución transpasiva, y decrece hasta el inicio de una pasivación secundaria de origen desconocido [13]. Este proceso podría explicar la respuesta registrada a pH = 9, donde se observó un aumento de la densidad de corriente a 0,853 V/ECS y luego una breve segunda pasivación hasta 1,063 V/ECS.

### Ensayos de biocompatibilidad

Los ensayos de biocompatibilidad se realizaron para evaluar la citotoxicidad de los aceros inoxidable analizados. Se entiende por citotoxicidad a la disminución de la proliferación celular inducida por un agente físico, químico o biológico. Los bioensayos se realizaron usando la línea celular UMR-106 debido a que su colágeno es similar al producido por los huesos del cuerpo humano, y fueron los siguientes:

- Ensayo de Rojo Neutro (RN): Esta técnica evalúa la pérdida de la viabilidad celular. Un determinado compuesto se denomina citotóxico cuando interfiere en el proceso de división y multiplicación celular, provocando una disminución de la velocidad de crecimiento celular, lo que se manifiesta en el número de células presentes en el cultivo.
- Ensayo de reducción del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico (MTT): Este ensayo determina la viabilidad celular, a partir de la capacidad de las células de reducir al MTT a un compuesto denominado

formazan, después de su exposición ante el compuesto cuya toxicidad se pretende evaluar.

- Ensayo de determinación de colágeno Tipo I: El ensayo consiste en la coloración del colágeno producido por las células osteoblásticas, mediante un dado colorante, en una solución saturada de ácido pícrico. El colorante fijado al colágeno se extrae y luego se mide su absorbancia.

En la Figura 5 se ilustran los resultados del ensayo de RN, donde si bien se observa una ligera disminución en el porcentaje de viabilidad celular en el cultivo correspondiente al acero Dúplex, las diferencias no son significativas respecto del control de referencia (CTR), siendo los porcentajes de viabilidad obtenidos de 98,3% para el ASTM F745 y de 94.1% para el Dúplex.

En cuanto al ensayo MTT, su reducción depende de la actividad metabólica mitocondrial, por lo tanto, las células con un metabolismo lento reducen muy poco MTT, mientras que las células que se dividen rápidamente exhiben altas tasas de reducción de MTT. Los valores reportados en la Figura 6 muestran que la viabilidad de las células plantea valores cercanos a CTR para ambos aceros inoxidables, dentro de los errores experimentales, lo que indica la ausencia de compuestos tóxicos que pueden afectar el metabolismo mitocondrial de las células.

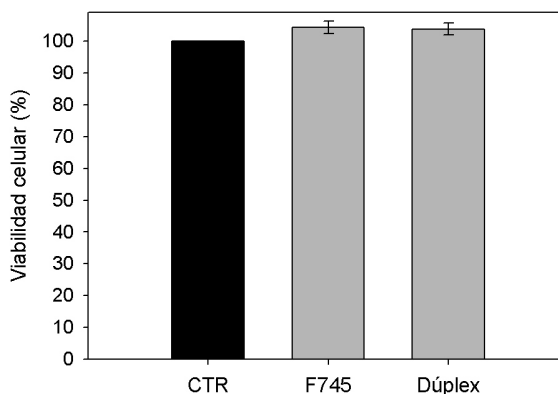


Figura 6. Ensayo MTT.

Por otro lado, el colágeno de Tipo I constituye 85% de la matriz extracelular del hueso y tiene un efecto importante en la diferenciación y la función de los osteoblastos que participan en la osteointegración del implante. El ensayo consiste en la coloración del colágeno producido por las células osteoblásticas en solución de ácido pícrico saturado. Este colorante se extrae y luego se mide su absorbancia para determinar la cantidad de colágeno producido. Los resultados mostrados en la Figura 7 revelan que la producción de colágeno alcanzó valores similares para ambos aceros inoxidables, siendo 94,0% para F745-SS y 91,7% para Dúplex-SS, por lo que se podría inferir que estos materiales no causan interferencia significativa en la función de los osteoblastos.

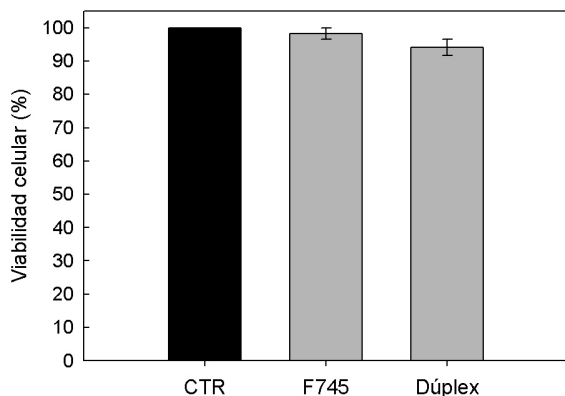


Figura 5. Ensayo de Rojo Neutro.

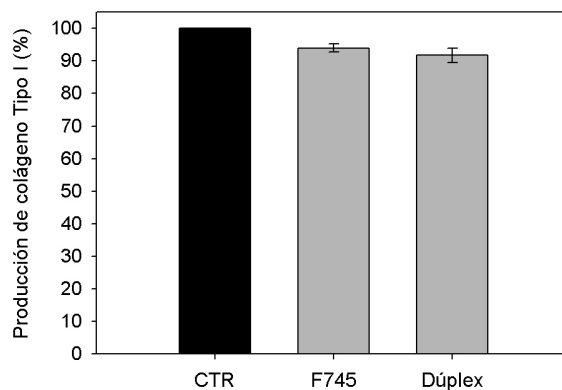
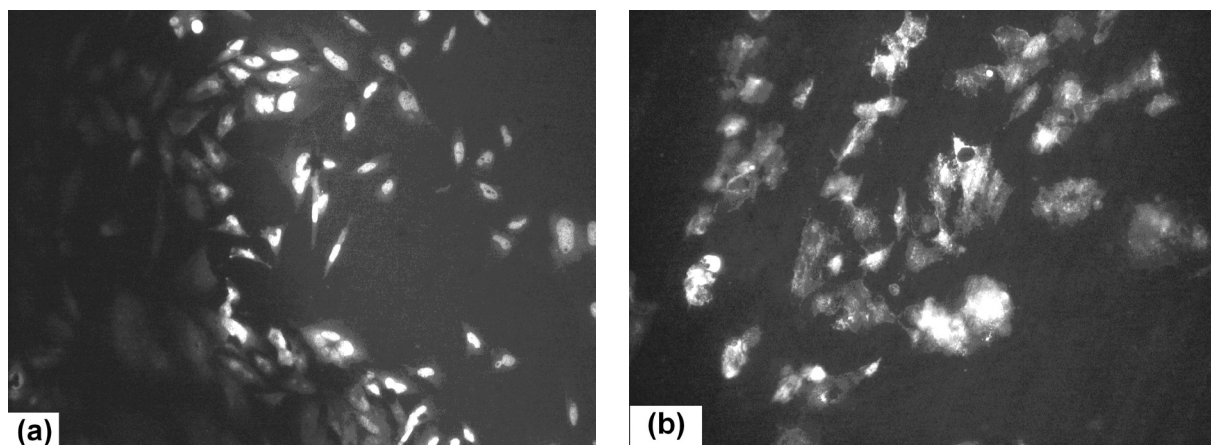


Figura 7. Producción de colágeno Tipo I.





**Figura 8.** Células UMR-106 sembradas sobre las superficies de los aceros. a) ASTM F745 y (b) Dúplex.

Como complemento de los ensayos citotóxicos, la Figura 8 muestra las células UMR-106 cultivadas en las superficies de los respectivos aceros inoxidable. Las células se colorearon con naranja de acridina para obtener un contraste más alto, encontrándose que la adherencia celular en las superficies ocurrió sin cambios en su morfología. Este resultado indica que ambos materiales permitirían una proliferación celular aceptable, lo que favorece la osteointegración.

### Conclusiones

En las condiciones de ensayo consideradas el acero inoxidable Dúplex ha mostrado menor susceptibilidad a sufrir corrosión localizada que el acero ASTM F745, al poseer un rango de pasividad más amplio y una mayor capacidad de repasivación. Estas propiedades no presentaron

variaciones significativas en el rango de pH considerado.

En cuanto a los bioensayos realizados para evaluar la citotoxicidad de ambos aceros, se ha observado que la viabilidad celular ha sido satisfactoria, evidenciando la ausencia de compuestos citotóxicos liberados al medio, en las condiciones de ensayo establecidas. Al mismo tiempo, las células sembradas sobre las respectivas superficies no sufrieron cambios en su morfología. De acuerdo a estos resultados, los aceros inoxidables analizados presentan una muy buena biocompatibilidad.

### Agradecimientos

Al LEMIT, a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, al CONICET y a la UNLP, por el apoyo económico brindado para el desarrollo del trabajo.

### REFERENCIAS

- 1.- M. Niinomi, Metallurgical and Materials Transactions 33 A (2002) 477.
- 2.- W. Bal, H. Kozlowsky, K. Kasprzak, Journal of Inorganic Biochemistry 79 (2000) 213.
- 3.- K. Yang, Y. Ren, Science and Technology of Advanced materials 11 (2010) 1.
- 4.- M. Sumita, T. Hanawa, S.H. Teoh, Materials Science and Engineering C 24 (2004) 753.

- 5.- A. Cigada, G. Rondelli, B. Vicentini, M. Giacomazzi, A. Roos, *Journal of Biomedical Material Research* 23 (1989) 1087.
- 6.- A. Cigada, G. De Santis, A. M. Gatti, A. Roos, D. Zaffè, *Journal of Applied Biomaterials* 4 (1993) 39.
- 7.- M. M. Beloti, J. M. D. A. Rollo, A. Itman Filho, A.L. Rosa, *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* 2 (2004) 162.
- 8.- J. Pan, C. Karlén, C. Ulfvin, *Journal of The Eletrochemical Society* 147 (2000) 1021.
- 9.- K. Oh, Y. Kim, Y. Park, K. Kim, *Journal of Biomedical Material Research B: Applied. Biomaterials* 69 (2004) 183.
- 10.- A. Kocijan, M. Conrado, *Materials and Technology* 44 (2010) 21.
- 11.- J. A. Platt, A. Guzman, A. Zuccari, D. W. Thornburg, B. F. Rhodes, Y. Oshida, B. K. Moore, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopeadics*, 112 (1997) 69.
- 12.- G. S. Frankel, *Metals Handbook 13A Corrosion Fundamentals, Testing and Protection* (pp. 591-599). ASM International Ohio (2003).
- 13.- J. G. N. Thomas, G. Hinds (Ed.), *The electrocheminal of Corrosion* (pp. 1-25). Jeeva4384 Publisher (2014).